

Departamento de Farmacia y Ciencias de los Alimentos – Farmazia eta Elikagien Zientzien Saila

Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CTA)

Trabajo de Fin de Grado (TFG)

Optimización del proceso de obtención de extractos proteicos en subproductos de leguminosas

Ainhoa Lasarte Mayoral

Director

Luis Javier Rodríguez Barron

Codirectora

Lara Morán Lobato

Curso 2020-2021

Índice

Resumen	1
1. Introducción.....	2
2. Objetivos	3
3. Desarrollo.....	4
3.1 Estimación de la producción de subproductos de leguminosas a nivel europeo	4
3.2 Optimización de la extracción proteica: diseño experimental, materiales y ensayos... 4	
3.2.1 Subproductos de leguminosas y pretratamiento de la muestra.	4
3.2.2. Optimización del proceso de extracción proteica	6
3.3. Resultados.....	10
3.3.1. Producción de subproductos de leguminosas	10
3.3.2. Composición de subproductos de leguminosas	13
3.3.3. Efecto del tipo de diluyente	13
3.3.4. Efecto de la relación subproducto/diluyente	15
3.3.5. Efecto del tiempo de mezclado	16
3.3.6. Efecto del punto isoeléctrico	16
3.3.7. Discusión general.....	17
4. Conclusiones.....	19
5. Bibliografía	20

Resumen

Las previsiones mundiales indican un incremento de la demanda de proteínas tanto para la alimentación humana como animal. Europa en particular, es una gran importadora de proteína, principalmente de soja. Este tipo de proteínas son poco sostenibles, desde una perspectiva económica y medioambiental, por tanto, resulta fundamental la búsqueda de nuevas fuentes proteicas. Europa es productora de leguminosas como lentejas, altramuz, alubias o guisantes, generándose en su procesado importantes cantidades de subproductos que en la actualidad son mayoritariamente desechados y que, sin embargo, podrían ser utilizados como fuente sostenible de proteína vegetal. En la actualidad son escasos los estudios realizados sobre el aprovechamiento del contenido proteico de estos subproductos, por ello es de gran interés para la industria alimentaria evaluar la posibilidad de emplear estos subproductos como fuente alternativa de proteína aplicando técnicas de extracción sostenibles. Ello permitirá además proporcionar una ruta de valorización de estos subproductos hacia compuestos de valor añadido. En el presente trabajo se han estudiado parámetros que afectan al proceso de extracción como el tipo de diluyente, la relación subproducto/diluyente, el tiempo de mezclado y el pH de precipitación. Sin embargo, las condiciones de extracción requieren una mayor investigación con el fin de conocer en profundidad los cambios producidos en las proteínas durante el proceso. Durante el periodo de prácticas tuteladas, se han realizado ensayos en el laboratorio comparando diferentes condiciones de extracción proteica a partir de subproductos de leguminosas.

1. Introducción

La demanda actual de proteínas para los 7.300 millones de habitantes del mundo es de aproximadamente 202 Mt. Estas proteínas provienen fundamentalmente de derivados cárnicos (59%), cereales (27%), vegetales (3,6%) y legumbres (1,6%) ⁽¹⁾. Europa tiene una dependencia de las proteínas importadas para alimentación animal del 70% ⁽²⁾, cifra que se incrementa para el caso de la soja hasta un 95% ⁽³⁾. En Europa hay aproximadamente 400.000 ha de soja cultivada, pero debido a sus rendimientos relativamente bajos y a su larga temporada de cultivo trae consigo problemas de sostenibilidad y escasez de oferta ⁽⁴⁾. A ello hay que sumarle los bajos precios que alcanza la soja en el mercado mundial.

Es por ello por lo que entró en vigor la Resolución del Parlamento Europeo, de 17 de abril de 2018, sobre una estrategia europea para la promoción de la producción de proteínas y leguminosas en el sector agrícola europeo (2017/2116(INI)) ⁽⁵⁾, donde se quiere disminuir la importación de proteínas vegetales de América del Sur, especialmente de la soja, ya que son muy poco sostenibles desde una perspectiva económica y medioambiental para Europa. Por tanto, la búsqueda de nuevas proteínas alternativas en una Europa preocupada por la sostenibilidad y la seguridad alimentaria es clave, y una opción podría ser la utilización de leguminosas, ya que tienen un perfil proteico que se puede asemejar al de la soja ⁽⁶⁾.

La producción de leguminosas en Europa ha aumentado en los últimos 10 años un 45,68%, gracias a diferentes variedades de legumbres como las lentejas, alubias, guisantes y altramuces ⁽⁷⁾. A su vez, el aumento en producción de leguminosas ha conllevado al incremento de desechos en las diferentes etapas de procesado de las mismas. El aumento de residuos alimentarios trae consigo problemas medioambientales y económicos para las diferentes empresas dedicadas a su producción. El sector hortofrutícola, donde se engloban la producción de leguminosas, es responsable de la generación de un 44% de desechos agrícolas a nivel mundial ⁽⁸⁾. Entre las fuentes alternativas de proteínas para alimentación animal y con aplicaciones para la alimentación humana, se encuentran estos subproductos del procesamiento de frutas y vegetales y, más concretamente, procedentes de leguminosas. Estos subproductos son biomasa de bajo costo, poco explotados, y no compiten con cultivos alimentarios tradicionales por espacio y recursos.

Los residuos alimentarios de leguminosas tienen un alto valor nutritivo, una alta concentración de compuestos orgánicos, alto valor de contenido en agua, y una alta capacidad antioxidante ⁽⁹⁾. A su vez, estos subproductos contienen compuestos muy importantes para el sector alimentario, como son las proteínas ⁽⁸⁾.

Desde un punto de vista tecnológico, las proteínas de leguminosas proporcionan estabilidad en los alimentos debido a su perfil de aminoácidos, cuyo componente principal es la lisina ⁽¹⁰⁾. Además, poseen propiedades tecnológicas como capacidad de emulsificación, espumante, hidrosolubilidad, capacidad de retención de agua (CRA) y capacidad formadora de gel (CFG). Estas propiedades van a contribuir a mejorar las características de apariencia, textura y estabilidad de los productos alimenticios en los que se incluyan ⁽¹¹⁾. La industria alimentaria está trabajando en la búsqueda de alternativas sostenibles donde poder llevar a cabo el aprovechamiento del perfil proteico de los subproductos de leguminosas generados.

Desde el punto de vista nutricional, las proteínas de origen alimentario han sido descritas como una importante fuente de hidrolizados y/o péptidos bioactivos. Estos compuestos peptídicos, además de su valor nutricional, pueden presentar actividad biológica con efectos beneficiosos sobre la salud como la regulación del sistema inmune ⁽¹²⁾⁽¹³⁾.

El principal problema de la extracción proteica de leguminosas radica en que los procesos actuales están desarrollados a pequeña escala, y su implantación es por tanto muy limitada en la industria alimentaria. Es por ello, que se están investigando nuevos procesos para que la obtención de extractos proteicos de subproductos de leguminosas se lleve a cabo de una manera sostenible y económica.

2. Objetivos

Por tanto, visto la problemática descrita anteriormente en la introducción, el objetivo principal del presente Trabajo de Fin de Grado (TFG) es optimizar el proceso de obtención de extractos proteicos a partir de subproductos de guisantes, altramuces, alubias y lentejas, para ser utilizados como fuentes alternativas de proteínas en formulaciones de piensos para animales y alimentos.

Los objetivos específicos son:

1. Conocer la cantidad y principales características de los subproductos generados en la industria alimentaria a partir de leguminosas.
2. Seleccionar diferentes ensayos de extracción de proteínas.
3. Evaluar las diferentes condiciones de extracción proteica para seleccionar aquellas que conlleven a la obtención de extractos con un alto contenido proteico.

3. Desarrollo

3.1. Estimación de la producción de subproductos de leguminosas a nivel europeo

De acuerdo con los datos publicados en la base de datos estadísticos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAOSTAT), se ha analizado la cantidad de producción de leguminosas que hubo en el año más reciente disponible, 2019⁽⁷⁾.

3.2. Optimización de la extracción proteica: diseño experimental, materiales y ensayos

3.2.1. Subproductos de leguminosas y pretratamiento de la muestra

La extracción proteica se realizó a partir de 4 variedades de subproductos de distintas leguminosas, como son la lenteja (*Lens culinaris*), la alubia (*Phaseolus vulgaris*), el guisante (*Pisum sativum*) y el altramuz (*L. angustifolius*). La figura 2 muestra el diagrama de flujo utilizado para el proceso de extracción proteica.

El primer paso del proceso consiste en realizar un pretratamiento de los subproductos de las semillas de las leguminosas. Se llevó a cabo la reducción del tamaño de los granos de leguminosas hasta la obtención de harina mediante una operación de triturado utilizando una trituradora Robot Coupe. El objetivo de esta técnica consiste en reducir el tamaño del grano mediante fuerzas de compresión para lograr un tamaño del mismo lo más reducido y homogéneo posible⁽¹⁴⁾. Para ello se utilizó una velocidad de giro de 3500 rpm entre 1 o 2 min, dependiendo del tipo de leguminosa. En el caso del altramuz y de la alubia, la duración del proceso fue de 2 min debido a que el tamaño del grano es mayor en comparación con el de la lentejas y el guisante, en los que el tiempo de triturado fue suficiente con 1 min. Este pretratamiento de las muestras facilita el proceso de extracción, ya que el pequeño tamaño de las partículas de harina dispersas en solución acuosa aumenta la solubilidad de las proteínas que contienen cuando el pH se encuentra por encima o por debajo del punto isoeléctrico de las mismas⁽¹¹⁾.

Una vez triturada la muestra se procedió a su tamizado. Esta operación consiste en una separación física para la homogeneización del tamaño de las partículas de la harina, y se realiza haciendo pasar la harina por un tamiz metálico de 2 mm de diámetro de poro, evitando de esta forma una excesiva pérdida de partículas. Las partículas con un tamaño menor a 2 mm se recogen para continuar el proceso mientras que las partículas de mayor tamaño son sometidas a un nuevo triturado para su posterior reutilización. De esta forma se aprovecha al máximo la harina obtenida a partir de los subproductos vegetales. Cabe destacar que, en el

caso de las lentejas y los guisantes, la cantidad de partículas de tamaño mayor a 2 mm fue insignificante, mientras que, en el caso de los altramuces y alubias la cantidad de partículas de mayor tamaño fue considerable debido a la mayor variabilidad y tamaño de las partículas de sus harinas.

Una vez obtenidas las harinas tamizadas de leguminosas, se procedió a su envasado al vacío utilizando una envasadora Egar Vac, y posteriormente se almacenaron a temperatura ambiente hasta realizar la extracción proteica.

El contenido total de proteína (%) de los subproductos de leguminosas fue determinado según el método Kjeldahl ⁽¹⁵⁾.

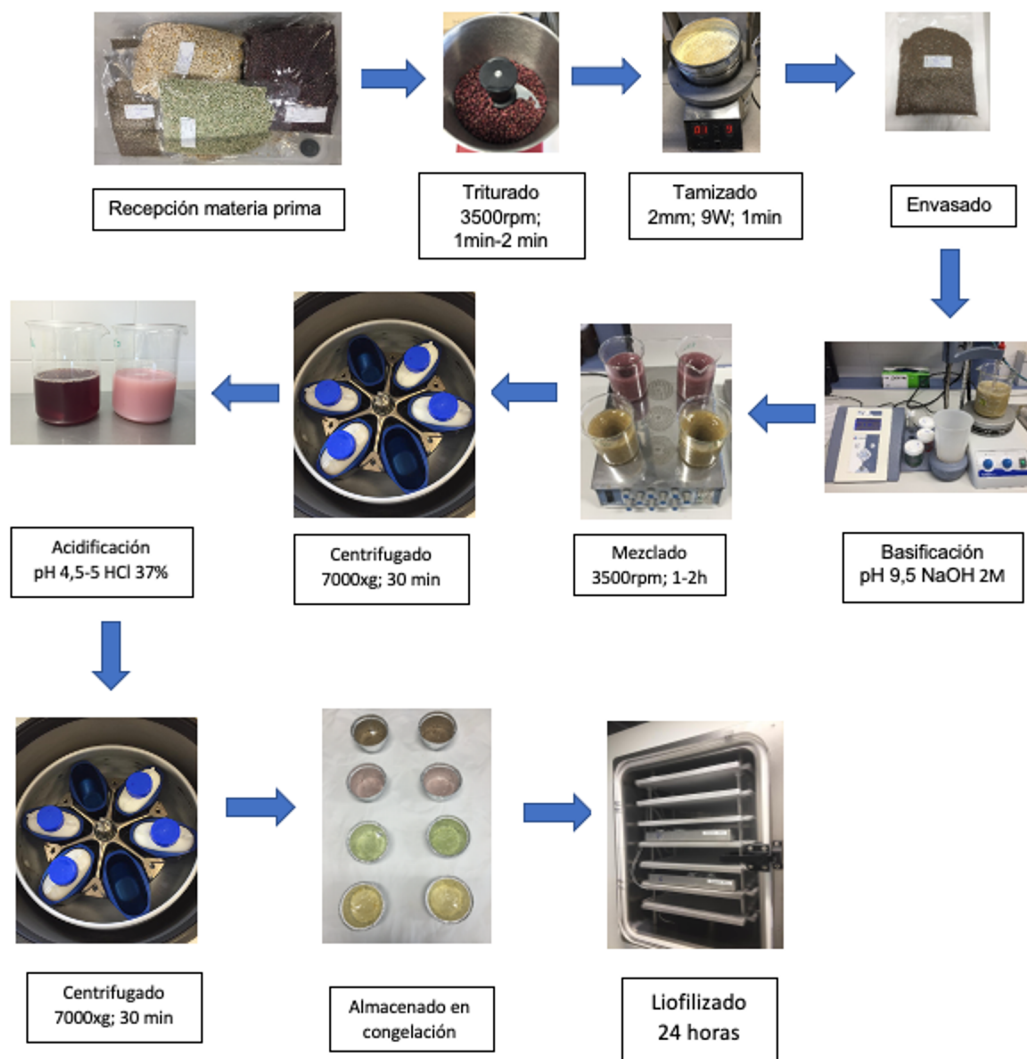


Figura 1: Diagrama de flujo de la extracción proteica

3.2.2. Optimización del proceso de extracción proteica

Pese a que existen numerosos ensayos para realizar la extracción proteica de leguminosas, en este trabajo se utilizó el método de extracción acuosa alcalina y salina seguida de precipitación isoeléctrica de proteínas.

La extracción de proteínas depende de diferentes factores como son el pH, la temperatura, el tamaño de partícula, la fuerza iónica, y la relación subproducto/diluyente ⁽¹¹⁾. Por tanto, los cambios que se lleven a cabo en las condiciones de los factores de extracción determinarán la cantidad de proteína final obtenida.

Teniendo en cuenta, como así se ha indicado anteriormente, que el objetivo de este TFG es seleccionar el ensayo más efectivo para poder extraer la mayor cantidad de proteína final de los diferentes subproductos de leguminosas, se han estudiado diversos parámetros del proceso de extracción como son el tipo de diluyente, la relación subproducto/diluyente, el tiempo de mezclado, y el valor del punto isoeléctrico.

A continuación, se describe la metodología del proceso de extracción. Se pesan 100 g de harina tamizada y se disuelven en dos relaciones muestra/diluyente (p/v), ajustadas dependiendo del ensayo. En la mayoría de los casos se usó agua como diluyente. Además, para comprobar el comportamiento de las proteínas de leguminosas en soluciones salinas se realizó un ensayo con tampón fosfato a pH de 7,2 con objeto de llevar a cabo el proceso de extracción a pH neutro. En los demás ensayos, se ajustó el pH a 9,5 mediante un pH-ímetro Crison utilizando una solución de NaOH 2M. De esta forma, se favorece la solubilización de las proteínas en la solución acuosa. Posteriormente, se sometió la solución proteica a una operación de mezclado a temperatura ambiente en una placa agitadora a 500 rpm durante 60 o 120 min (dependiendo del ensayo). De esta forma, se induce al líquido (agua destilada) y al sólido (muestra de subproducto de leguminosa), a que su contacto se acelere mediante los movimientos circulatorios que son generados en el interior de la solución por medios mecánicos⁽¹⁴⁾.

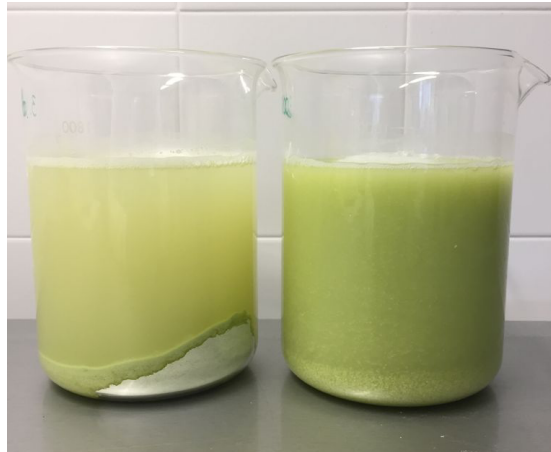


Figura 2: A la izquierda se observa la solución de proteínas sin haber sido sometidas a la operación de mezclado, y a la derecha la solución de proteínas una vez pasado el tiempo de mezclado.

Tras el mezclado se procedió al centrifugado de la solución utilizando una centrifuga Sorvall Bios 16. La solución proteica se somete a 7000 g durante 30 minutos a una temperatura de 4°C para evitar posibles deterioros de las proteínas. Esta técnica de separación se basa en el aislamiento de partículas suspendidas en un líquido gracias a la fuerza centrífuga; de esta forma, se puede separar las partículas insolubles del sobrenadante⁽¹⁴⁾. Tras el centrifugado, se desechó el precipitado y se conserva el líquido sobrenadante en el que se encuentran las proteínas solubilizadas. A continuación, se procedió a realizar su precipitación isoelectrica ajustando el pH a su punto isoelectrico, en torno a 4,5-5,0 (dependiendo del ensayo) utilizando una solución de HCl al 37%. Este fenómeno conlleva a la disminución de solubilidad⁽¹¹⁾ y precipitación de las proteínas, el cual genera un cambio de color en la muestra como se observa en la figura 3.



Figura 3: A la izquierda se observa la solución de proteínas solubles en agua a pH neutro, y a la derecha la proteína precipitada en su punto isoelectrico.

Tras la precipitación, la mezcla se centrifugó a 7000 g durante 30 minutos a 4°C. En esta ocasión, se desecha el sobrenadante y se conserva el precipitado de proteínas (Figura 4).



Figura 4: Extractos proteicos obtenidos a partir de harina de guisante (verde) y altramuz (amarillo).

Se pesaron los extractos proteicos obtenidos utilizando una balanza Ohaus Scout con una exactitud de $\pm 0,01$. Posteriormente, se almacenaron en congelación a una temperatura de -18°C , para su posterior liofilizado. Los extractos se liofilizaron en un equipo Teslar LyoBeta durante 24 horas para evitar la desnaturalización de proteínas⁽¹⁴⁾.

Por último, los extractos liofilizados se pesaron en la misma balanza donde fueron pesados los extractos proteicos centrifugados.



Figura 5: Extractos proteicos liofilizados obtenidos a partir de harinas de leguminosas.

En la Tabla 1, se muestra el diseño experimental utilizado para la optimización de las condiciones de extracción de las proteínas a partir de los de los diferentes subproductos de leguminosas descritos anteriormente. Cada uno de los ensayos fue realizado por duplicado.

Una vez realizado todos los ensayos de extracción proteica, se procede a analizar los resultados de cada ensayo para cada tipo de subproducto de leguminosa, para poder comprobar cuál sería el ensayo adecuado para cada subproducto de leguminosas. De esta forma, se puede observar cómo afectan los diferentes parámetros al rendimiento de la extracción de proteínas de las diferentes leguminosas, para así poder determinar las condiciones óptimas para realizar la extracción en cada caso.

Tabla 1: Diseño experimental utilizado para la optimización de las condiciones de extracción de las proteínas a partir de los subproductos de leguminosas.

Ensayo	Relación subproducto/diluyente (p/v)	Diluyente	tiempo (min)	pH
Ensayo 1	1:15	Agua	60	4,5
Ensayo 2	1:15	Agua	60	5,0
Ensayo 3	1:15	Agua	120	4,5
Ensayo 4	1:10	Agua	60	4,5
Ensayo 5	1:05	Tampón fosfato pH 7,2 + NaCl 0,1M	120	4,5

Como se observa en la tabla 1, en la mayoría de los ensayos el diluyente utilizado ha sido agua destilada, ya que las proteínas de las leguminosas son mayoritariamente globulinas y albúminas, y tienen buena hidrosolubilidad. El ensayo 5 con tampón a pH 7,2, se llevó a cabo para comparar cuál de los dos diluyentes (agua o tampón fosfato) provocaba una mejor solubilización de las proteínas. El parámetro de relación subproducto/diluyente en varios ensayos se ajustó a una relación 1:10 en vez de 1:15 (p/v), para comprobar si es posible disminuir la cantidad de agua necesaria para realizar la extracción proteica. En los ensayos se han utilizado dos tiempos de mezclado (60 y 120 min) para verificar si a mayor tiempo de mezclado se incrementaban las interacciones subproducto/diluyente. Por último, el valor del pH correspondiente al punto isoeléctrico de las proteínas se modificó en los ensayos 2 y 5 para observar si en esas condiciones de extracción se generaban mayores desestabilizaciones de las proteínas.

3.3. Resultados

3.3.1. Producción de subproductos de leguminosas

La industria alimentaria desecha al año una gran cantidad de residuos alimentarios. Entendemos como residuo alimentario, según la Ley 3/2020, de 11 de marzo, de prevención de las pérdidas y el despilfarro alimentarios ⁽¹⁶⁾, el alimento que se ha convertido en residuo. Estos residuos alimentarios traen consigo problemas económicos y medioambientales y, por lo tanto, la mejor opción sería gestionarlos adecuadamente para reducir su cantidad o incluso indagar en nuevos procesos industriales que permitan la transformación de dichos residuos en productos alimentarios con un valor nutricional.

Los subproductos de leguminosas son generados durante el proceso de transformación de estos vegetales. Antes de realizar su procesado, las semillas frescas son sometidas a diversas operaciones unitarias donde se realiza su clasificado, mediante operaciones de separación física y química como son la separación por gravimetría, por tamaño y/o, por color ⁽⁸⁾. Aquellos granos que tienen mayor densidad son descartados debido a su grado de madurez mediante la separación gravimétrica. Mediante la separación por tamaño van a ser descartados aquellos granos que no cumplen con el tamaño requerido, y el último parámetro a controlar es el color de los granos. Los pigmentos que aportan color a las leguminosas son muy inestables y durante el procesamiento post-cosecha aquellos granos que no tengan el color adecuado van a ser descartados y se van a considerar subproducto ⁽¹⁷⁾. Especialmente el color afecta a las lentejas, ya que cambios en el contenido de clorofilas y polifenoles conllevan la decoloración del producto ⁽¹⁸⁾.

En la Figura 6, se observa el diagrama de flujo del procesado de leguminosas, y las operaciones destacadas en color rojo es donde se desechan los subproductos.

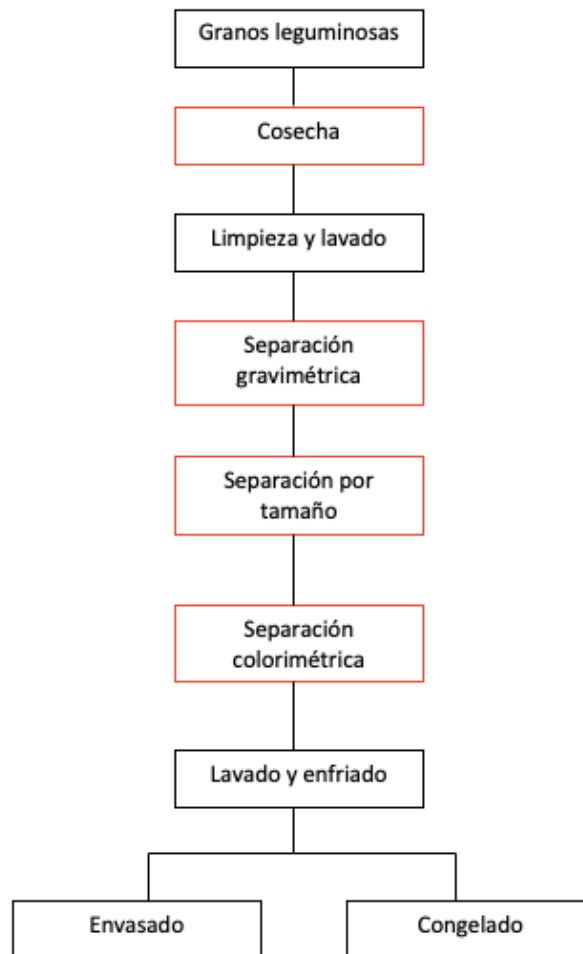


Figura 6: Diagrama de flujo del procesado industrial de leguminosas; las etapas coloreadas en rojo son donde se generan los subproductos ⁽¹¹⁾

En el caso de los subproductos de leguminosas es complicado estimar y cuantificar la cantidad de residuos que pueden ser generados durante el procesado, debido a que se trata de un sector muy heterogéneo y, a su vez, se pueden generar desechos muy variables ⁽¹⁹⁾; como, por ejemplo, granos rotos (6-13%), germen, polvo (7-12%), y cáscaras; además de otros residuos que pueden tener un valor nutricional interesante como vainas y granos de leguminosas que no van a ser procesados en la industria. Los granos no procesados, se encuentran en una cantidad en torno al 20-30% de la producción total de granos ⁽¹¹⁾. El grano no procesado es desechado por atributos como el color, el tamaño y la madurez. El subproducto de granos no procesados de leguminosas contiene diversos compuestos de alto

valor nutricional como son las proteínas, las cuales pueden ser utilizadas para alimentación animal y humana ⁽¹⁸⁾. Es por ello, que en vez de desechar el subproducto de leguminosa se puede valorizar extrayendo su proteína, para poder hacer uso del residuo alimentario, evitando problemas medioambientales y económicos.

Por lo tanto, si se genera un subproducto de granos no procesados entre el 20-30% se podría llegar a calcular la cantidad de subproducto que se genera en relación con la producción anual en Europa.

Tabla 2: Comparación de la producción de leguminosas y los subproductos generados en Europa el año 2019 ⁽⁷⁾

Muestras	Producción de leguminosa (t)	Subproducto generado (t)	
		20%	30%
Lenteja	3,67x10 ⁵	7,35 x10 ⁴	1,10 x10 ⁵
Alubia	1,25 x10 ⁵	2,50 x10 ⁴	3,74 x10 ⁴
Guisante	3,93 x10 ⁵	7,86 x10 ⁴	1,18 x10 ⁵
Altramuz	5,25 x10 ⁶	1,05 x10 ⁶	1,57 x10 ⁶

Por lo tanto, teniendo en cuenta que se generan entre 1,2 y 1,8 Mt de subproducto de leguminosas en Europa, se podría llevar a cabo la revalorización de los mismos recuperando sustancias de alto valor nutricional como son las proteínas. Dado que en la actualidad se importan un total de 30 Mt de soja, de las cuales 1,3 Mt son proteínas, la dependencia de las industrias europeas de la proteína de soja disminuirá de un 95% a un 92%.

Debido a la complejidad de cuantificar la cifra de los subproductos generados, la decisión delegada (UE) 2019/1597 de la comisión de 3 de mayo de 2019 por la que se complementa la Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que concierne a una metodología común y a los requisitos mínimos de calidad para la medición uniforme de los residuos alimentarios ⁽²⁰⁾, ha propuesto diferentes metodologías para poder cuantificar los subproductos de leguminosas para así reducir la carga de residuos generados en las distintas fases de la cadena alimentaria. Esta regulación propone realizar un control y medición de residuos por separado, y en el caso de las legumbres, se propone la realización de una medición directa y de un balance de masas del proceso. Por otro lado, también se sugiere la realización de cuestionarios y entrevistas, cálculos de coeficientes y estadísticas de producción, así como el análisis de la composición de los residuos.

3.3.2. Composición de los subproductos de leguminosas

En primer lugar, se ha llevado a cabo un análisis del contenido total de proteína en cada subproducto. Como se puede ver en la Tabla 3, todos los subproductos de leguminosas contienen una concentración proteica mínima entorno al 20%, excepto el altramuz, que es muy superior alrededor del 37%. Aunque se trate de subproductos, algunos investigadores han extraído concentraciones similares de proteína de leguminosas como de la alubia (20%) y del altramuz (33-44%)⁽¹⁸⁾. No ocurre lo mismo con el guisante y la lenteja, ya que la cantidad de proteína obtenida en este trabajo ha sido menor en comparación con otros investigadores los cuales obtuvieron 31% y 26%⁽²¹⁾ respectivamente.

La soja tiene aproximadamente un 40% de proteína y el subproducto que más se asemeja a este contenido es el del altramuz⁽²²⁾. Debido a la gran concentración de proteína que presenta la soja, los subproductos de lenteja, guisante y alubia van a tener menores rendimientos, por tanto, es necesaria la búsqueda de otras nuevas fuentes alternativas de proteína.

Tabla 3: Contenido de proteína de los subproductos de leguminosas

Subproducto de leguminosa	Proteína (%)
Lenteja	23,29 ±0,06
Alubia	20,19 ±0,13
Guisante	20,03 ±0,02
Altramuz	37,37 ±0,19

3.3.3. Efecto del tipo de diluyente

En primer lugar, se ha comprobado si la utilización de una solución salina a pH neutro en lugar de agua destilada mejoraba la recuperación de proteína (ensayos 1 y 5; Tabla 1). El efecto del tipo de diluyente dependerá principalmente de los tipos de proteína contenidos en el subproducto⁽¹¹⁾. Como ya se ha comentado con anterioridad, las proteínas mayoritarias en las leguminosas son globulinas, que representan el 70% de la proteína total y son solubles en disoluciones salinas diluidas, las albúminas que representan un 10-20% y son solubles en agua, y las gluteninas que representan un 10-20% y son solubles en soluciones muy ácidas o básicas⁽²³⁾.

Las proteínas de leguminosas son solubles en agua cuando el medio ronda unos valores de pH entre 7-10. Cuanto más básico sea el pH más soluble será la fracción proteica ⁽²⁴⁾. En este trabajo, la utilización del tampón fosfato (ensayo 5, Tabla 1) ocasionó un descenso en el contenido de proteína obtenido en comparación con el uso de agua destilada como diluyente (ensayo 1, Tabla 1). La cantidad de proteína obtenida se redujo casi a la mitad en lenteja, guisante y alubia, mientras que el efecto fue menos importante para el altramuz (Tabla 4) Esto podría deberse a que a pH neutro se generan tanto cargas negativas como positivas en las proteínas, generando un valor de carga neta en la estructura proteica, lo cual favorece la solubilidad de las proteínas en agua ⁽²⁵⁾. Por tanto, pese a que las globulinas representen la mayor cantidad de proteína y sean solubles en soluciones salinas, la insolubilidad de las albúminas y las gluteninas va a conllevar a que parte de la proteína se insolubilice debido a la formación de agregados proteicos ⁽²⁵⁾. En cambio, en los ensayos en los que se ha hecho uso de agua destilada, y el valor del pH correspondía con el pI, se ha recuperado mayor cantidad de proteína debido a la formación de agregados insolubles entre proteínas con carga neta nula. Karaca et al. (2011) ⁽⁶⁾, observaron que se generan extractos con mayor contenido proteico en soluciones acuosas que en salinas; y además que las proteínas obtenidas en soluciones acuosas alcalinas presentaban mejores propiedades tecno-funcionales.

Tabla 4: Contenido proteico de extractos obtenidos con diferente tipo de diluyente: agua destilada (ensayo 1) y tampón fosfato (ensayo 5).

Ensayo	Proteína (%)			
	Lenteja	Alubia	Guisante	Altramuz
1	15±0,4	10±0,2	10±0,2	20±0,4
5	6±0,3	3±0,0	6±0,4	12±0,4

3.3.4. Efecto de la relación subproducto/diluyente

La relación de subproducto/diluyente fue modificada para comparar si a menores cantidades de agua era posible generar las mismas interacciones de las proteínas con las moléculas de agua, favoreciendo su solubilidad. Para ello se han comparado proporciones subproducto/diluyente de 1:10 y 1:15 (p/v). En la mayoría de las leguminosas (alubia, guisante y altramuz) se han obtenido cantidades de proteínas muy próximas entre sí, mientras que en el caso de la lenteja se ha observado un pequeño efecto a la baja en la extracción proteica con la menor relación subproducto/diluyente de 1:10 (p/v). Por tanto, estos resultados indican que se podría utilizar menor cantidad de agua para obtener la misma concentración de proteína en el extracto. Los autores Boye et. al. (2010) ⁽²¹⁾ realizaron un estudio en el cual se aplicó una relación muestra/agua de 1:10 (p/v), y en el que las concentraciones de proteína obtenidas fueron para el guisante de un 13% y para la lenteja de un 12%. En el caso de la lenteja, los valores obtenidos son similares, pero no ocurre lo mismo para el guisante, ya que en el ensayo se obtiene un 4% menos de proteína. Esto pudo ser debido a que las interacciones proteína-agua no se produjeron correctamente y, por tanto, se produjo una pérdida de proteínas por insolubilización. Sería necesario volver a realizar el ensayo para comprobar si hubo algún error cometido durante el proceso de extracción. Incluso se podría realizar de nuevo el pretratamiento de la leguminosa para comprobar si la muestra utilizada en el ensayo anterior poseía algún tipo de defecto o situación particular.

Aunque a pequeña escala la utilización de cualquiera de las relaciones subproducto/diluyente parece ser eficiente, es necesario también mantener su eficiencia a escala industrial, y, por tanto, la utilización de menores cantidades de agua (ensayo 4, Tabla 1) sería la más recomendable con este fin.

Tabla 5: Contenido proteico de extractos obtenidos con diferente relación subproducto/diluyente: 1:15 (ensayo 1) y 1:10 (ensayo 4).

Ensayo	Proteína (%)			
	Lenteja	Alubia	Guisante	Altramuz
1	15±0,4	10±0,2	10±0,2	20±0,4
4	12±0,8	10±0,0	9±0,3	19±0,2

3.3.5. Efecto del tiempo de mezclado

Con el incremento del tiempo de mezclado se podría generar mayor contacto entre las proteínas y las moléculas del diluyente, aumentando, en consecuencia, los niveles de recuperación de proteína a partir de los subproductos de leguminosas.

Se puede observar que pese al aumento de tiempo de mezclado de 60 a 120 min (ensayos 1 y 3, Tabla 6) no existe, para el caso de la alubia, lenteja y altramuz, una mayor extracción de proteína. En el caso del subproducto del guisante, por el contrario, se obtuvo una mayor concentración de proteína a mayor tiempo de mezclado (Tabla 6), siendo del 4% el aumento de la concentración proteica final. No se ha podido realizar ninguna comparación con otros trabajos, ya que no se han encontrado artículos previos al respecto en la literatura científica.

Por ello, se establece de forma general 60 min como tiempo de mezclado recomendable, consiguiendo también de esta forma un potencial ahorro de tiempo y energía en el escalado industrial.

Tabla 6: Contenido proteico de extractos obtenidos con diferente tiempo de mezclado: 60 min (ensayo 1) y 120 min (ensayo 3)

Ensayo	Proteína (%)			
	Lenteja	Alubia	Guisante	Altramuz
1	15±0,4	10±0,2	10±0,2	20±0,4
3	14±0,1	11±0,1	14±0,3	18±0,4

3.3.6. Efecto del punto isoeléctrico

El interés del valor de pH del medio coincidente con el punto isoeléctrico de las proteínas es que en ese punto se produce la agregación por floculación de la mayor cantidad de proteínas posibles del subproducto. Posteriormente van a ser sometidas a la operación de centrifugado y las proteínas deben de estar insolubilizadas para conseguir una buena separación del precipitado y del sobrenadante. El punto isoeléctrico que ocasiona la precipitación de las proteínas contenidas en los subproductos de leguminosas se encuentra en un valor de pH entre 4,5 y 5,0 ⁽²⁶⁾. A estos valores de pH las proteínas poseen carga neta nula lo cual va a

ocasionar la disminución de una gran parte de las interacciones electrostáticas con las moléculas de agua, y el aumento de interacciones intercatenarias entre moléculas de proteínas para formar agregados insolubles debido principalmente a fuerzas de Van Der Waals que generan interacciones hidrofóbicas e interacciones proteína-proteína ⁽²⁶⁾. En el ensayo 2 se ha establecido un pH de precipitación de 5,0 para comprobar si a un valor de pH un poco menos ácido es posible también precipitar el mismo contenido de proteína que en valor de 4,5. Como se puede observar en la Tabla 7, a pH de 5,0 la concentración de proteína se reducen considerablemente en comparación con los obtenidos a pH 4,5. Por tanto el ensayo 1, muestra que el pH óptimo de precipitación proteica para los subproductos de las leguminosas estudiadas está en un valor de 4,5. En este valor de pH se forman agregados por floculación, debido a las interacciones proteína-proteína disminuyendo la solubilidad de las proteínas y manteniendo su estructura nativa estable ⁽¹¹⁾. En comparación con la literatura científica, no se ha encontrado ningún artículo donde se utilice un valor de pH de 5,0 como punto isoeléctrico de precipitación de proteínas de leguminosas. De todas formas, la proporción de proteína obtenido en el ensayo 2 ha sido menor en todos los subproductos analizados, por tanto, el punto isoeléctrico de los cuatro subproductos se estableció en un valor de pH de 4,5.

Tabla 7: Contenido proteico de extractos obtenidos con diferente valor de pH: I 4,5 (ensayo 1) y 5,0 (ensayo 2).

Ensayo	Proteína (%)			
	Lenteja	Alubia	Guisante	Altramuz
1	15±0,4	10±0,2	10±0,2	20±0,4
2	5±0,3	6±0,7	7±0,3	16±0,3

3.3.7. Discusión general

En la figura 7, se muestra la concentración de proteína obtenida en los diferentes ensayos realizados en cada uno de los subproductos de leguminosas seleccionados.

Los resultados mostraron que, en general, el ensayo 5 en el cual se utilizó como diluyente el tampón fosfato fue el que obtuvo menor contenido de proteína en todos los subproductos. Lo mismo ocurrió con el ensayo 2 en el que se utilizó un pH de precipitación de 5,0. En general, se puede indicar que los parámetros que tuvieron mayor efecto en el proceso de extracción de proteínas, fueron el pH de precipitación, y el tipo de diluyente.

Los ensayos 1,3 y 4 obtuvieron extractos con contenido proteico bastantes similar para los subproductos de leguminosas. Por tanto, cualquiera de esos ensayos serían adecuados para realizar la extracción proteica de subproductos de lentejas, alubias, guisantes y altramuces, siendo ligeramente más eficiente, en la mayoría de los casos, el ensayo 1.

Los extractos con mayor contenido proteico se obtienen a partir de subproducto de los altramuces, con un valor de proteína en torno al 20% mientras que los que presentan menor cantidad de proteína son los obtenidos a partir de guisantes y de alubias, con un 10% de proteína. Como era de esperar, estos resultados van en línea con la cantidad de proteína total que presentó cada subproducto antes del proceso de extracción de la misma (Tabla 3). Sin embargo, si se compara el porcentaje de proteína en el subproducto y el existente en el extracto proteico final, el mayor rendimiento de extracción se consiguió con la lenteja (65,0%), seguido del altramuz (53,4%) y finalmente del guisante (49,9%) y la alubia (49,5%).

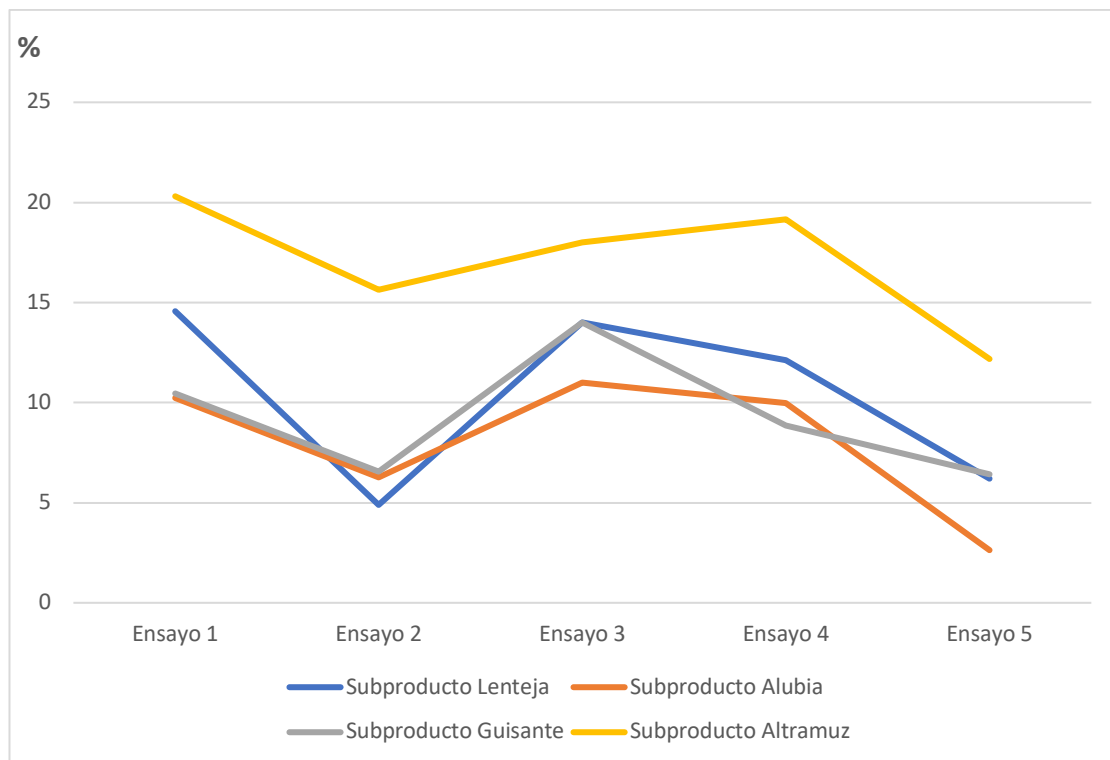


Figura 7: Comparación de la cantidad de proteína (%) obtenida a partir de diferentes subproductos de leguminosas utilizando los 5 ensayos del diseño experimental de la Tabla 1.

4. Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que las condiciones óptimas para la extracción de proteínas a partir de los subproductos de leguminosas seleccionadas es una extracción con agua destilada, con una relación subproducto/diluyente de 1:10 (p/v), con un tiempo de mezclado de 60 min y con un valor de pH de precipitación isoelectrica de 4,5. En términos comparativos, en las condiciones óptimas de extracción, los mayores rendimientos de proteína se consiguieron para el altramuz, siendo la lenteja la que presentó un mayor rendimiento de extracción. Los resultados de este trabajo son preliminares y, por tanto, se requieren estudios adicionales para determinar de forma más profunda las condiciones óptimas de extracción de proteínas a partir de subproductos de leguminosas, a distintos escalados, y a su vez, buscar nuevas fuentes de proteína para la industria alimentaria que permitan disminuir la actual dependencia del uso e importación de soja como fuente principal de proteína.

5. Bibliografía

1. Maria de Visser CL, Schreuder R, Stoddard F. The EU's dependency on soya bean import for the animal feed industry and potential for EU produced alternatives. OCL. 2014; 21(4): 1-8.
2. The European Association for Bioindustries. The EU Protein gap trade policies and GMOs. EuropaBio [Internet]. 2018 [consulta el 20 de abril de 2020] 4-24. Disponible en: <https://www.gmoinfo.eu/uk/files/353-eu-protein-gap-wcover-06-08.pdf>
3. Delegation of the European Union to Ethiopia. Follow-up to the EU-U.S. Joint Statement of 25 July: Imports of U.S. soybeans increase by over 280%. EEAS. [Internet]. 2018 [consulta el 20 de abril de 2020] Disponible en: https://eeas.europa.eu/delegations/ethiopia/49023/follow-eu-us-joint-statement-25-july-imports-us-soybeans-increase-over-280_ro
4. Tallentire CW, Mackenzie SG, Kyriazakis I. Can novel ingredients replace soybeans and reduce the environmental burdens of European livestock systems in the future? J Clean Prod 2018; 187: 338-347.
5. Resolución del Parlamento Europeo, 17 de abril de 2018, sobre una estrategia europea para la promoción de las proteaginosas: fomentar la producción de proteínas y leguminosas en el sector agrícola europeo. Diario Oficial de la Unión Europea, nº C390/01, (17 abril 2018)
6. Karaca AC, Low N, Nickerson M. Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. Food Res Int 2011; 44(9): 2742-2750.
7. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [Internet]. Italia: FAOSTAT 2019; [consulta el 16 de abril de 2021]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>

8. Tassoni A, Tedeschi T, Zurlini C, Cigognini IM, Petrusan J, Rodríguez Ó, et al. State-of-the-art production chains for peas, beans and chickpeas—valorization of Agro-Industrial residues and applications of derived extracts. *Molecules* 2020; 25(6): 1383.
9. Helkar PB, Sahoo AK, Patil NJ. Review: Food industry by-products used as a functional food ingredients. *Int J Waste Resour* 2016; 6(3): 1-6.
10. Qayyum MMN, Butt MS, Anjum FM, Nawaz H. Composition analysis of some selected legumes for protein isolates recovery. *J Anim Plant Sci* 2012; 22(4): 1156-1162.
11. Singhal A, Karaca AC, Tyler R, Nickerson M. En: Aakash Goyal. Pulse proteins: from processing to structure-function relationships. Grain legumes. Vol 55. 1ª ed. Canada: IntechOpen; 2016.
12. Abuine R, Rathnayake A.U., Byun H-G. Biological activity of peptides purified from fish skin hydrolysates. *Fish Aquatic Sci* 2019; 22(1): 1-14.
13. Sanchez A, Vázquez A. Bioactive peptides: A review. *FQS* 2017; 1(1): 29-46.
14. Barbosa-Canovas GV, Ibarz A. Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos. Madrid. Mundi-Prensa Libros: 2005.
15. Chang SK, Zhang Y. Protein analysis. En: Nielsen SS, editor. Food analysis: Springer. 5ª ed. Springer; 2017; p.15-331.
16. Ley 3/2020, de 11 de marzo, de prevención de las pérdidas y el despilfarro alimentarios. Boletín Oficial del Estado, nº 78, (21 marzo 2020)
17. Zhong L, Fang Z, Wahlqvist ML, Wahlqvist ML, Wu G, Hodgson JM. Seed coats of pulses as a food ingredient: Characterization, processing, and applications. *Trends Food Sci Technol* 2018; 80: 35-42.

18. Luzardo-Ocampo I, Cuellar-Nuñez ML, Oomah BD, Loarca-Piña G. Pulse By-products. En: Campos-Vega R, Oomah BD, Vergara-Castaneda H, editores. Food Wastes and By-products: Nutraceutical and Health Potential. Vol. 1ª ed. México: Wiley; 2020; p. 59-92.
19. Stenmarck Å, Jensen C, Quested T, Moates G, Buksti M, Cseh B, et al. Estimates of European food waste levels. 1ª ed. IVL Swedish Environmental Research Institute; 2016.
20. Decisión Delegada (UE) 2019/1597 de la comisión de 3 de mayo de 2019 por la que se complementa la Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que concierne a una metodología común y a los requisitos mínimos de calidad para la medición uniforme de los residuos alimentarios. Diario Oficial de la Unión Europea, nº L 248/77, (27 septiembre 2019)
21. Boye J, Zare F, Pletch A. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. Food Res Int 2010; 43(2): 414-431.
22. Jayasena V, Chih HJ, Nasar-Abbas S. Functional properties of sweet lupin protein isolated and tested at various pH levels. Am J Agric Biol Sci 2010; 6(2): 130-137.
23. Bessada SMF, Barreira JCM, Oliveira, M. Beatriz P. P. Pulses and food security: Dietary protein, digestibility, bioactive and functional properties. Trends Food Sci Technol. 2019; 93: 53-68.
24. Gençdağ E, Görgüç A, Yılmaz FM. Recent advances in the recovery techniques of plant-based proteins from agro-industrial by-products. Food Rev Int 2021; 37(4): 447-468.
25. Damodaran S, Parkin KL. Aminoácidos, péptidos y proteínas. En: Damoran S, Parkin KL, editores. FENNEMA Química de los alimentos. 4ª ed. Wisconsin: Acribia S.A.; 2002. p. 383-475.

26. González Mañas JM. Curso de biomoléculas. Desnaturalización de proteínas
[Internet]. España: UPV/EHU [consulta el 20 de mayo de 2021]. Disponible en:
<http://www.ehu.eus/biomoleculas/proteinas/desnaturalizacion.htm>